



(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 9 - 2 7 8 6 6 3

(43) 公開日 平成9年(1997)10月28日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/78	A C B		A 6 1 K 35/78	A C B B
	A B S			A B S
	A B X			A B X

審査請求 未請求 請求項の数 4

O L

(全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平8-322020

(22) 出願日 平成8年(1996)12月2日

(31) 優先権主張番号 08/631738

(32) 優先日 1996年4月10日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 596173838

ペーター ローデワルド

ドイツ連邦共和国 ディー-48341 アル  
テンベルグ, シュルツェーイズフォルトシ  
ュトラーセ 4番地

(72) 発明者 ペーター ローデワルド

ドイツ連邦共和国 ディー-48341 アル  
テンベルグ, シュルツェーイズフォルト  
シュトラーセ 4番地 -

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54) 【発明の名称】 カイガンショウからの抽出物 (Pycnogenol TM) の経口投与によるヒト血小板の反応性の調節方法

(57) 【要約】

【課題】 ヒト血小板の反応性を調節する方法を提供する。

【解決手段】 カイガンショウの樹皮からの抽出物を 1 日当たり 200 ~500mg 投与する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 カイガンシヨウ (maritime pine) の樹皮からの抽出物を1日当たり 200から500mg 投与するヒトの血小板凝集の調節方法。

【請求項2】 1日当たり約 250から350mg 投与する請求項1に記載の方法。

【請求項3】 経口投与を用いる請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 50から150mg の1回量単位を投与する請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒト血小板の反応性の調節方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】血小板凝集は、多様な心臓血管疾患の主な原因の1つである。動脈硬化の病因のうち、内皮の病変を除き、血小板凝集物の血管壁への付着を引き起こす血小板凝集の活性化が、血栓形成の最初の段階の1つである。それゆえ、血小板凝集の阻害は脳卒中予防に利用されている。アセチルサリチル酸(ASA)は、良く知られた血小板凝集阻害剤であり、動脈血栓、脳梗塞又は心筋梗塞の予防に関する臨床試験で成功を収めている。ASAはボランティア及び高い危険度の患者において、梗塞形成の数を減少させることも見出されている。しかし、患者のある特定群では、血小板凝集をASAによって予防できない。これらの患者において抗血栓効果を欠く理由の1つは、アドレナリンがASAの存在下でさえ血小板凝集を誘発できるという事実である。アドレナリンはストレスの下で産生されるので、ASAの抗血栓予防に効果しない者は、応答する者よりも大きい連続的なストレスの下に置かれていると考えられる。

【0003】心臓血管疾患の高い危険度の原因の1つは喫煙である。喫煙は血小板の反応性を増加させる。ニコチンは血栓形成を誘発することが明らかにされている。さらに、ニコチン以外にたばこのタール画分も血小板の反応性を増加させ得る。ASAが喫煙による血小板凝集の促進を抑制できることは明らかにされている。しかし、この場合も、ASAは冠状動脈心臓疾患の男性において喫煙により誘発される血小板の機能亢進を予防することはできない。

【0004】従って、ASAの作用機序、すなわちシクロオキシゲナーゼの不可逆的アセチル化はいずれの場合においても血小板凝集を阻害することはできないと考えられる。予防効果を欠くこれらの場合以外に、ASAの常用に伴う副作用は、比較的低投与量を使用しても全く無視できるとはいえない。さらに、胃からの出血及びASAによって誘発される喘息のようなアレルギー反応又はライエル症候群のような皮膚反応を考慮に入れなければならない。

【0005】出血又はアレルギー性喘息を起こすことなく、増加する血小板の反応性を抑制する物質により血小板凝集を阻害することができれば、梗塞形成の予防における利益と危険との比率は改善されるであろう。更なる利点はアドレナリンによって誘発される血小板凝集を阻害する物質により達成されるであろう。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】それゆえ、本発明の目的の1つは、出血傾向の指標としての出血時間に有害作用を及ぼすことなく、促進された血小板の反応性を正常化できる物質を提供することである。本発明の別の目的は、喫煙によって誘発された血小板の反応性についての実験モデルで試験したとき、ASAと同程度に血小板の反応性を正常化するだけでなく、加えてアドレナリンによって誘発された血小板凝集をも防止する物質を提供することである。さらに別の目的は、特にアドレナリンによって誘発された血小板凝集を阻害することによって、ヒト血小板の反応性を調節する方法を提供することである。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】これらの目的は、カイガンシヨウ (maritime pine) の樹皮からの抽出物であるピナス・マリチマ (Pinus maritima) を、血小板凝集を調節するためにヒトに投与する方法によって達成される。カイガンシヨウの樹皮からの上記抽出物は、以下ではピクノゲノール (Pycnogenol) (登録商標) と呼ばれる。

【0008】ピクノゲノールは、C-C結合によって結合したカテキン及びエピカテキン単位からなるプロシアニジンを含み、二量体、三量体、6-7分子の鎖長までの他のオリゴマー、フェノール性酸及びそのグルコース誘導体を形成する (Blazso, G., Gabor, M., Sibbel, R. 及び Rohdewald, P., Pharm. Pharmacol. Lett. 3, 217 (1994) 「ピナスピナスタノール (Pinus pinaster Sol.) の樹皮及びその画分からの抽出物を含むプロシアニジンの抗炎症性及び超酸化ラジカル掃去活性」)。ピクノゲノールは、本明細書中に参考として組み入れる USP 4, 698, 360 に従って生成される。本発明で使用する抽出物は本質的には次の方法によって調製することができる。粉碎したカイガンシヨウの樹皮を沸騰水で抽出し、濾過後の抽出物を塩化ナトリウムで飽和するか又は硫酸アンモニウムを20% w/v まで加える。生じる沈殿物を分離し、上清を1/10容量の酢酸エチルで繰り返し抽出し、酢酸エチル抽出物を集めて乾燥する。乾燥させた抽出物を濃縮し、それを3容量のクロロホルムに攪拌しながら注ぎ、生じる沈殿物を集める。酢酸エチルへの溶解とクロロホルムによる沈殿物を繰り返し行ない沈殿物を精製してもよい。また、この抽出物を調製するために、同じ成分の抽出物を得ることのできる他の抽出法を用いてもよい。

【0009】プロシアニジンは、in vitroにおける血小板凝集を正常化し、その効果はASAに匹敵する。血小板

凝集に対するその阻害効果は、トロンボキサンの生合成が無細胞系及び無傷の血小板においてプロシアニジンにより阻害されるという事実によって説明される(Chang, W.-C., Hsu, F.-L., Prostaglandins, Leukotrienes and essential fatty acids, 38, 181-188(1989)「プロシアニジンによる血小板凝集及び血小板のアラキドン酸代謝の阻害」)。動物又はヒトにおいて毛細管を強化する物質としてピクノゲノールを用いると、浮腫の形成を抑制することができる(Gabor, M., Engi, Etelka, Sonkodi, S., Phlebologie, Schattauer Verlagsgesellschaft mbH 1993, S. 178-182「自然発生高血圧ラットにおける水溶性フラボン(Flavon)誘導体による毛細管強化及びその影響」; Schmidtke, I., Schoop, W., Swiss. Med. 6, Nr. 49(1984)「浮腫及び薬剤の影響」)。

【0010】さらに、ピクノゲノールは動物においてラジカル掃去活性(radical scavenging activity)及び抗炎症特性を有していることが知られている(Blazso, G., Gabor, M., Sibbel, R. 及びRohdewald, P., Pharm. Pharmacol. Lett. 3, 217(1994)「ピナスピナストル(Pinus pinaster Sol.)の樹皮及びその画分からの抽出物を含むプロシアニジンの抗炎症性及び超酸化ラジカル掃去活性」)。ヒトにおける血小板の反応性の阻害を、これらの特性によって説明することはできない。

【0011】本発明は、ピクノゲノールを経口で摂取すると喫煙によって誘発され促進されるヒト血小板の反応性を阻害すること、及びピクノゲノールはin vitroでアドレナリンによって誘発されるヒト血小板の凝集をも正常化することの発見に基づく。ピクノゲノールは、空腹時に摂取すると胃腸障害のような軽度の副作用のみを起すことが知られている。食事と同時に摂取すれば、そのような副作用は起こらないことが報告されている。

【0012】本発明の新しい使用法は、ASAの摂取に関連した有害作用を生じないで、特に出血時間に影響を与えないで、促進した血小板の反応性の正常化を可能とする。これは、ASAと対照的にピクノゲノールがヒトにおける出血時間の増加を引き起こさないことによる。ラジカル掃去剤及び抗炎症剤として使用される場合の1日当たり100mgというピクノゲノールの投与量とは対照的に、促進した血小板の反応性の正常化のための投与量は\*

$$\text{EDTA中の血小板} \times \text{ホルマリン-EDTA中の赤血球}$$

$$= \text{PR}$$

$$\text{ホルマリン-EDTA中の血小板} \times \text{EDTA中の赤血球}$$

PRは凝集した血小板の数とともに直線的に増加する。

【0015】図1は、喫煙後の血小板の反応性が期待通りに増加したことを標準偏差を用いて示す。喫煙によって誘発された血小板凝集は、ASA(p=0.06)及びカイガンショウ樹皮抽出物(p=0.08)によって有意に正常化された。従って、ピクノゲノール100mgを1回投与すると、喫煙によって誘発される血小板凝集をASA 500mgと同程度まで正常化することができることが分かる。両処置の

\*1日当たり200-500mg、好ましくは1日当たり約250-350mgであり、1回投与量は約50-150mgである。カイガンショウの樹皮からの抽出物は乾燥形態(例えば錠剤、コーティング錠、植込錠、カプセル若しくはカシエ剤)又は一般的な製薬溶媒で調製した液剤として投与することができる。通常製薬的に許容し得る賦形剤、希釈剤又は担体を使用してもよい。

【0013】本発明を次の実施例及び添付図面によって説明する。図1は、ASAを摂取しなかった場合、ASA 500mgを摂取した場合、及びピクノゲノール100mgを摂取した場合における喫煙後の血小板反応性の増加を示すとともに、喫煙前の値に対する血小板反応性指数の差ΔPRを与えることによってASA及びピクノゲノールの効果を示す図である。図2は、ASA 500mgを投与した場合、ピクノゲノール100mgを投与した場合及び薬物を投与しなかった場合の出血時間を示す図である。図3は、カイガンショウ樹皮抽出物をin vitroで加えた後のアドレナリンによって誘発される血小板の反応性の減少を示す図である。

#### 【0014】

##### 【実施例】

##### 実施例1

実験は、地方倫理委員会の同意書及び許可書を得て、喫煙家の健康な男性22人によって実施した。ASA 500mg又はピクノゲノール(カイガンショウの樹皮からの抽出物)100mgを錠剤として与え、2-3時間後に最初の採血を行ない、その後2週間の間隔で採血した。予め、ブラUNK実験を行ない基本値を求めておいた。最初の採血直後30分以内に3本のたばこを吸わせた。その後、採血を繰り返して行なった。EDTA緩衝液で満たしたシリンジ及びEDTA-ホルムアルデヒド緩衝液で満たした別のシリンジ中に血液300μlを懸濁させた。両方のサンプル中の赤血球の数を数えた。EDTAサンプル中では、互いに又は赤血球に付着した活性化血小板が溶解したのに対して、EDTA-ホルムアルデヒド液中では固着したままであった。遠心分離を行なうと単一の血小板のみが上清に残った。両方の上清中の血小板の数を血小板計数機によって計算した。血小板の反応性の指数(PR)を次のように計算した。

軽微な相違は重要ではない。

【0016】出血時間は、喫煙前に耳たぶに穴を開けて測定した。図2は、薬物を用いない場合の出血時間と、カイガンショウ樹皮抽出物を摂取した後の出血時間に有意差はないが、ASAを摂取した後の出血時間は有意に長くなることを示す(p=0.002)。ピクノゲノール100mgを摂取した後の出血時間は、ASA 500mgを摂取した後の出血時間よりも有意に短い。

【0017】この実施例により、ピクノゲノールはASAと比べてとき出血時間に影響を与えずに低投与量で血小板凝集を正常化することが明らかである。

#### 【0018】実施例2

次の実験を実施して、アドレナリンによって誘発される血小板凝集を阻害するのに適した濃度でピクノゲノールを使用できるか否かを決定した。血液サンプルを健康な

凝集率(ブランク) - 凝集率(カイガンショウ樹皮抽出物)

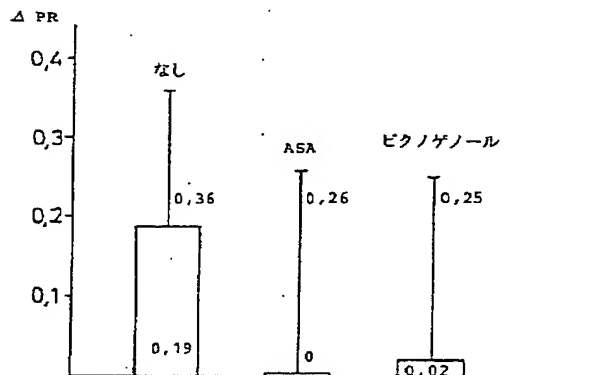
$$\text{阻害率} = \frac{\text{凝集率(ブランク)} - \text{凝集率(カイガンショウ樹皮抽出物)}}{\text{凝集率(カイガンショウ樹皮抽出物)}} \times 100$$

この実施例(図3)は、ピクノゲノールはアドレナリンの存在下でさえも血小板凝集を有意に阻害することを示す。

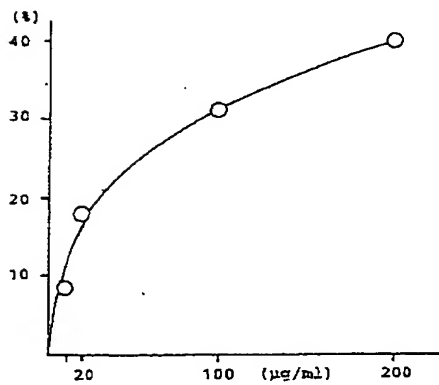
【図面の簡単な説明】

【図1】△PRによってASA及びピクノゲノールの効果を示す図である。

【図1】



【図3】



ボランティアから集め、遠心分離を繰り返して行なうことにより血小板を豊富に含んだ血漿を得た。アドレナリンを加えた後に異なる濃度のピクノゲノールとともにブレインキュベーションした場合としなかった場合とにおいて、凝集率を濁度測定によって測定した。阻害率を以下のように計算した。

【図2】ASA 500mgを投与した場合、ピクノゲノール 100mgを投与した場合及び薬物を投与しなかった場合の出血時間を示す図である。

【図3】カイガンショウ樹皮抽出物をin vitroで加えた後のアドレナリンによって誘発される血小板の反応性の減少を示す図である。

【図2】

